

BEST AVAILABLE COPY
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE04/1210



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 25 639.3

REC'D 06 SEP 2004

Anmeldetag:

6. Juni 2003

WIPO

PCT

Anmelder/Inhaber:

Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

Bezeichnung:

Verfahren zum Feststellen optimaler Implantations-
bedingungen durch Bestimmungen von humanem
endometrialen Choriogonadotropin

IPC:

G 01 N, A 61 B

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 27. August 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen. Es ist die Aufgabe gestellt, den Zeitpunkt einer erfolgversprechenden Implantation des Embryos im aktuellen und/oder daraus schließend die Rezeptivität im Folgezyklus zu bestimmen. Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von endometrialem hCG in der Schleimhaut der Cervix und des Corpus uteri (u.a. evt. Mundschleimhaut), des Peripherblutes der sekretorischen Zyklusphase oder im Menstrualblut.

Dafür werden spezifische Antikörper mit dem Epitop zum C-terminalen Ende der β hCG-Untereinheit im ELISA-Test verwendet, die Aminosäuredifferenzen im Exon 2 und Exon 3 der β hCG-Untereinheit zwischen endometrialem und trophoblastären Gewebe erkennen und quantifizieren können.

Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch die Bestimmung von humanem endometrialen hCG und/oder β hCG im Serum, Plasma und im Peripherblut der Lutealphase (prospektiv) sowie im Menstrualblut (retrospektiv). Die Freisetzung des endometrialen hCG ist Ausdruck ungestörter sekretorischer Transformation des Endometriums.

Die Erfindung betrifft ferner einen Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

Es ist bereits bekannt, das trophoblastäre Gesamtmolekül hCG (Total-hCG) allein oder in der Summe mit den freien Untereinheiten zu bestimmen. Dafür sind unterschiedliche Testkits vorgeschlagen worden, die mit unterschiedlicher Spezifität arbeiten (1) und die Bestimmung von holo-hCG (Total-hCG), β hCG und α CG ermöglichen (2). Die Heterogenität des hCG im biologischen Material (intaktes α , β -Heterodimer, freies α CG, freies β hCG, β hCG core-Fragment, nicked hCG, nicked β hCG), bezogen auf die Bindung an den jeweilig verwendeten Antikörper, erschweren die genaue Bestimmung und die Standardisierung eines Nachweisverfahrens für das endometriale hCG (3-5). Eine zusätzliche Heterogenität der hCG-Bestimmung in der späten Lutealphase und frühen Schwangerschaft kann im geringen Grad auch zwischen den vier nativen, hyperglykosylierten oder desialylierten Kohlenhydratseitenketten des C-terminalen Endes (CTP) von β hCG (Aminosäure 113 - 145), wie sie different zwischen früher und mittlerer Schwangerschaft und bei Chorioncarcinom im trophoblastären β hCG beobachtet worden sind, auftreten (4, 6-10). Weiterhin kann die Variation des Alanin, A (Endometrium) und Aspartat, D (Trophoblast) in der Aminosäureposition 117 des C-terminalen Endes von β hCG (β CG-CTP) bei endometrialem, blastozytärem und trophoblastärem β hCG für die Epitop-Spezifität des verwendeten Antikörpers von Bedeutung sein (11). Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des β hCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met, P - M).

Die bisher etablierten Verfahren haben den Nachteil, keine ausreichende Aussage über die Differenziertheit der exprimierten hCG-Gene treffen zu können. Das hat seine Ursache darin, daß die Verfahren die Heterogenität der vorliegenden β hCG-Epitope aus jeweils endometrialem, trophoblastärem, leukozytärem oder chorioncarcinomähnlichen Ursprung nicht erfassen.

Die Erfindung hat das Ziel, ein Verfahren zur Bestimmung von humanem endometrialen hCG und/oder β hCG anzugeben, das unter Einsatz eines leicht handhabbaren Testkits die zuverlässige Aussage einer vorausgegangenen optimalen oder minderwertigen sekretorischen Transformation des Endometriums bzw. einer bestehenden optionalen Implantationsvoraussetzung für einen Embryo oder für die frühzeitige Diagnose einer erfolgten Schwangerschaft ermöglicht.

Die Erfindung hat folgende Aufgabe zu lösen:

- Aussagen zur sekretorischen Transformation des Endometriums im normalen, gestörten und hormonstimulierten Zyklus,
- frühzeitige Diagnostik eines implantationsfähigen Endometriums,
- frühzeitige Diagnostik einer Schwangerschaft in Kombination von endometrialem und trophoblastärem hCG,
- Differenzierung eines early pregnancy loss,
- Differenzierung zwischen Extrauterin gravidität und intrauteriner Schwangerschaft,
- Differenzierung falsch positiver hCG-Werte (zum Beispiel der hCG-Titer bei Patientinnen nach IUD-Einlage).

Das Verfahren richtet sich auf die Angabe einer Schrittfolge zur Bestimmung von endometrialem hCG und/oder β hCG ($e\beta$ hCG), womit die angegebene Zielfunktion erreicht werden kann.

Der Erfindung liegt die wissenschaftlichen Erkenntnisse zugrunde, daß im sekretorischen Endometrium gesunder nichtschwangerer Frauen epitheliales hCG und/oder β hCG gebildet wird (12-15). Auch in der Dezidua wird bei Patientinnen mit Extrauterin-gravidität hCG und/oder β hCG im Drüsenepithel nachgewiesen (16). Der Nachweis erfolgt durch Immunhistochemie, in situ-Hybridisierung, Western Blot und RT-PCR. Nach Sequenzierung wurde von uns nachgewiesen, daß die β -Untereinheit des endometrialen hCG ($e\beta$ hCG) different zum herkömmlichen trophoblastären hCG ($t\beta$ hCG) ist, vor allem im Promotorgen des Exon 1 und auch im Exon 3. Das zeigt, daß $e\beta$ hCG vom Gen 7 und 6 translatiert wird, während trophoblastäres β hCG vorwiegend vom Gen 5 und auch Gen 8 und 3 gebildet wird.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß das erste in der Frühschwangerschaft nachgewiesene β hCG entgegen der allgemeinen Auffassung nicht $t\beta$ hCG ist, sondern $e\beta$ hCG. Die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen β hCG wird hier erstmals in SEQ ID No 5 und SEQ ID No 7 dargestellt (Endo). Da die Aminosäure- und Nukleotidsequenz des endometrialen hCG in SEQ ID No 5 und No 7 nicht ausschließlich hCG β 7 oder hCG β 6 ist, bezeichnen wir die endometriale Gensequenz als Gen β 6e.

Die Erfindung vermeidet die Nachteile bisher bekannter Methoden und der zu der Durchführung entwickelten Testkits der Total-hCG/ β hCG-Bestimmung durch den Einsatz des endometrium- und deziduaepithel-spezifischen $e\beta$ hCG-Antikörpers im Verfahren des Testansatzes.

Dafür werden spezifische Antikörper mit veränderter Aminosäuresequenz im Exon 2 (Position +4) und Exon 3 (Position +117) entwickelt und eingesetzt, die nur den endometrialen hCG- und/oder β hCG-Anteil im Serum, Plasma und Peripherblut sowie im Menstrualblut erfassen.

Der endometriale hCG- und/oder β hCG-Anteil kann aber auch mit dem in der Erfindung angegebenen Verfahren der Quotientenbildung von hCG- und/oder β hCG-Meßwerten als Wert Menstrualblut durch Wert Serum mit den herkömmlichen Total-hCG/ β hCG-Immunoassays erfaßt werden.

Die Erfindung wird nachstehend an Ausführungsbeispielen näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiel 1:

Der Patientin wird zur Diagnostik Peripherblut der mittleren bis späten Sekretionsphase entnommen (Heparinblut, Blut). Das Plasma oder Serum wird bis zur Messung bei -20° C gelagert.

Als Antigenmaterial für die Antikörpergewinnung des endometrialen hCG und/oder β hCG werden zum einen je ein synthetisches Peptid der Aminosäuresequenz 109 - 118 oder 109 - 122 oder sequenzversetzt für das hCG β 7, β 6 und hCG β 5, β 8, β 3 des C-terminalen Endes (CTP) im Exon 3 eingesetzt:

ehCG β 7, β 6, β 6e (AS 109 - 122):

109	110		115	117		120	122						
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Ala	- Ser	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

thCG β 5, β 8, β 3 (AS 109 - 122):

109	110		115	117		120	122						
Thr	- Cys	- Asp	- Asp	- Pro	- Arg	- Phe	- Gln	- Asp	- Ser	- Ser	- Ser	- Ser	- Lys

und weiterhin eine Zell-Linie humaner endometrialer Drüsenepithel-Zellen wie RL95-2 oder eine andere Zell-Linie (humane uterine epitheliale Zell-Linie RL 95-2).

Vor dem Einsatz der endometrialen Epithelzellen wird die mRNA-Expression des hCG β 7, β 6, β 6e im Promotorgen Exon 1 und im Exon 3 (CTP) in den nativen Zellen und nach Kultur mit RT-PCR geprüft und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die monoklonalen Antikörper der CTP-Peptide und der Endometrium-Epithel-Zell-Linie gegen hCG β 7, β 6 werden nach Immunisierung, Isolierung, Hybridisierung und Fein-

reinigung in vorgegebener Vorschrift hergestellt und bei - 20° C gelagert. Dazu werden zunächst sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse mit einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie immunisiert. Aus den Milzen derart immunisierter Mäuse werden die Zellen isoliert und mit Mausmyelomzellen fusioniert. Die geeigneten Myelomzellen P3-X63-Ag8.653 (17) werden in RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum gezüchtet. In einem Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (18), werden die gebildeten Hybridzellen von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt und Zellklone selektiert, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren. Die Selektierung der Hybridome erfolgt in an sich bekannter Weise, ein besonders produktives Hybridom wird ausgewählt. Die Herstellung von Hybridomen, welche Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren, ist zuverlässig wiederholbar. Eine Hinterlegung ist deshalb nicht erforderlich.

Sandwich-ELISA: Die gereinigten monoklonalen Antikörper (Mab) werden an ELISA-plates (96 wells) adsorbiert (8 µg/ml in PBS, 1 Stunde, 37° C) mit anschließendem Blocken und Waschen; Antigeninkubation (100 µl, 1 Stunde, 37° C) mit hCG und/oder βhCG oder dem synthetischen Peptid hCG β7, β6, β6e als Standardreihe und dem Heparinplasma in Blocking-Puffer; Bestimmung des Sandwich-Mab, gekoppelt an HRP type IV (Sigma) zu 100 µl für 1 Stunde, 37° C nach der Methode von Wilson und Nakane (19).

Menstrualblut: Kann wie Peripherblut nach Zentrifugation zur Abtrennung von Zellen und Stroma für den direkten hCG β7, β6-CTP (AS 109 - 118; 109 - 122)-ELISA und dem hCG β7, β6 (AS -5 bis +5) eingesetzt werden.

Perfusat nach Corpusabrasio: Einsatz nach Zentrifugation für die beiden beschriebenen ELISA-Tests.

Ausführungsbeispiel 2:

Neben der bekannten Änderung der Aminosäuresequenz in Position 117 des CTP vom Exon 3 des βhCG für nicht-trophoblastäres hCG haben wir eine weitere Differenz der Aminosäure bei Position 4 im Exon 2 zwischen Trophoblast und Endometrium finden können (Pro - Met).

Alternativ zum Ausführungsbeispiel 1 wird als Antigenmaterial für die Antikörpergewinnung des endometrialen hCG und/oder β hCG zum einen je ein synthetisches Peptid der Aminosäuresequenz - 5 bis + 5 oder sequenzversetzt oder erweitert für das endometriale oder trophoblastäre β hCG neben einer humanen uterinen epithelialen Zell-Linie wie RL 95-2 eingesetzt:

ehCG β 7, β 6, β 6e (AS -6 bis +6):

-6	-5				-1	+1				+4	+5	+6
Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Lys	Glu	Met	Leu	Arg	

thCG β 5, β 8, β 3 (AS -6 bis +6):

-6	-5				-1	+1				+4	+5	+6
Met	Gly	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	

Vor dem Einsatz der endometrialen Epithelzellen wird die mRNA-Expression des hCG β 7, β 6 im Promotorgen Exon 1 und im Exon 2 bei Aminosäureposition +4 in den nativen Zellen und nach Kultur mit RT-PCR geprüft und durch Sequenzanalyse bestätigt.

Die monoklonalen Antikörper werden weiter wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben hergestellt und in den beschriebenen ELISA-Test-Anordnungen eingesetzt. Außerdem besteht die Option in Kombination von Ausführungsbeispiel 1 und Ausführungsbeispiel 2 die gesamte Aminosäuresequenz von -4 bis +122 oder eine Ligation mit beiden angegebenen Aminosäuresequenzen als Antigen für die Antikörpergewinnung zu benutzen (sowohl für Aminosäuresequenz ehCG β 7, β 6 als auch thCG β 5, β 8, β 3).

Ausführungsbeispiel 3:

Gewinnung von Menstrualblut nach normalem Zyklus, nach Hormontherapie, nach IVF und ET ohne erfolgreiche Implantation sowie bei vorgesehener Diagnostik des Zyklus bei Kinderwunschpatientinnen und bei IUD-Patientinnen.

10

Parallele Gewinnung von Peripherblut zum selben Zeitpunkt als Heparinblut oder Serum zum Ausschluss eines erhöhten unspezifischen Serum-hCG-Wertes ist unbedingt erforderlich.

Vergleich der hCG- und/oder β hCG-Konzentration im biologischen Material der Desquamation des endometrialen Gewebes nach Separation der epithelialen und Stromazellen, der peripheren mononukleären Blutzellen, der mononukleären Immunzellen des endometrialen Epithels oder des Stromas für die hCG- und/oder β hCG-Bestimmung.

Bei einer definierten Differenz hohen Anteils von hCG und/oder β hCG im Menstrualblut zu niedrigem Anteil im Peripherblut kann von lokaler endometrialer Bildung ausgegangen werden. Für das Peripherblut kann allein der übliche trophoblastäre hCG β 5, β 8, β 3 -Hormontest (ELISA, MEIA u. a.) verwendet werden.

Der auszuwertende Meßwert berechnet sich aus der Quotientenbildung der Konzentration vom Total-hCG/ β hCG-Meßwert im Menstrualblut durch den Meßwert im Plasma oder Serum.

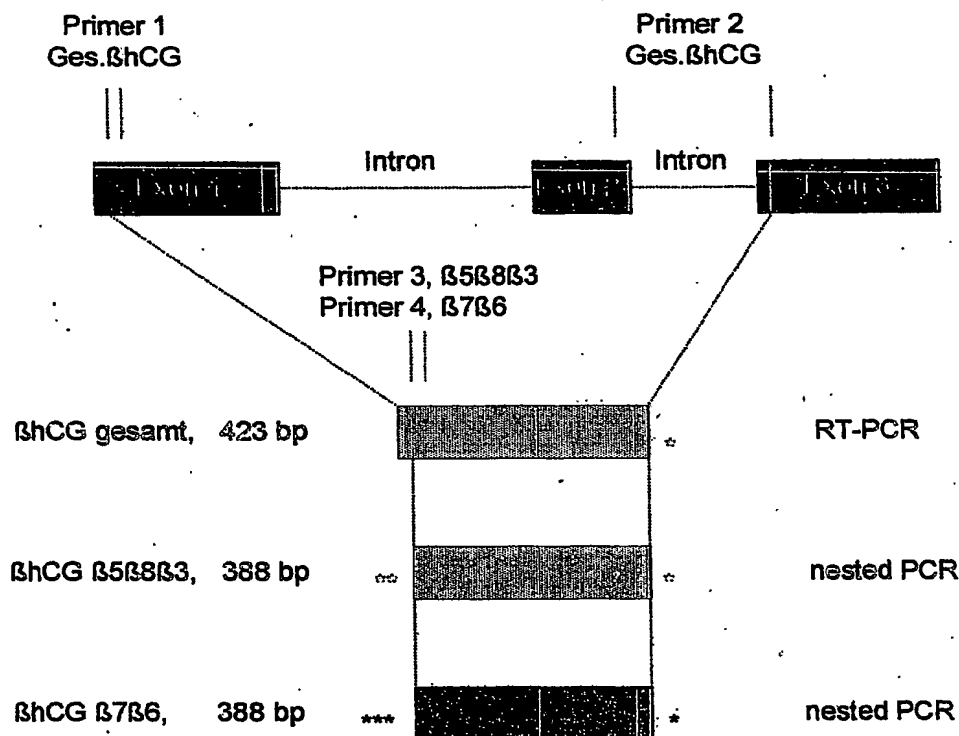
Patentansprüche:

1. Verfahren zum *Feststellen* optimaler Implantationsbedingungen im aktuellen oder Folgezyklus durch Bestimmen von humanem hCG, dadurch gekennzeichnet, daß der Patientin Peripherblut der mittleren bis späten Sekretionsphase oder Menstrualblut entnommen wird, eine an sich bekannte hCG-Bestimmung mit einem kommerziellen Testkit vorgenommen wird und die Konzentration des hCG absolut oder relativ zum Meßwert in einem zweiten Test für hCG bestimmt wird.
2. Verfahren zum *Feststellen* optimaler Implantationsbedingungen im aktuellen oder Folgezyklus durch Bestimmen von humanem endometrialen hCG, dadurch gekennzeichnet, daß der Patientin Peripherblut der mittleren bis späten Sekretionsphase oder Menstrualblut entnommen wird, ein *ELISA-Test* mit dem von aus einer Endometrium-Epithel-Zelllinie und einer Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 erhaltenen Hybridom produzierten monoklonalen Antikörper vorgenommen wird und die Konzentration des endometrialen hCG absolut oder relativ zum Meßwert in einem zweiten ELISA-Test für übliches trophoblastäres hCG bestimmt wird.
3. Verfahren zum *Feststellen* optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen hCG, dadurch gekennzeichnet, daß je ein ELISA-Test mit *synthetischen Peptiden* von Exon 3 mit AS 109 bis 122, von Exon 2 mit AS -6 bis +6 oder auch von synthetischen Peptiden mit Anteilen innerhalb der Aminosäuresequenz -6 bis +122, in allen Fällen auch sequenzversetzt, dargestellt und zur Messung des endometrialen hCG verwendet wird.
4. Testkit zum *Erkennen* optimaler Implantationsbedingungen, bestehend aus einem Enzymimmunoassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma oder Menstrualblut und einem monoklonalen Antikörper, produziert von einem Hybridom, das aus einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie I und der Myelomzell-Linie P3X63-Ag8.653 erhalten wird.
5. Testkit zum Bestimmen physiologischer Implantationsbedingungen, bestehend aus einem Enzymimmunassay zum Bestimmen von humanem endometrialen hCG im Serum/Plasma und einem monoklonalen Antikörper, produziert von ei-

112

nem Hybridom, das hergestellt wird durch Immunisierung von sechs bis acht Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäuse mit einer Endometrium-Epithel-Zell-Linie, Isolierung der entsprechenden Zellen aus den Milzen der Mäuse und der Fusionierung mit einer Mausmyelomzelllinie, Klonierung und Subklonierung der Hybridome und Verwendung eines produktiven Klons, der die monoklonalen Antikörper in vivo oder in vitro produziert.

6. Aminosäuresequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 5 und Gensequenz hCG β 6e laut SEQ ID No 7.



Fluoreszenzmarker: * NED, ** HEX, ***6-FAM

115-09-03

115

Zitierte Nicht-Patent-Literatur:

- (1) L.A.Cole, *Clin.Chem.*, **43** (1997) 2233-2243
- (2) P.Berger, C.Sturgeon, J.M.Bidart et al., *Tumor Biol.*, **23** (2001) 1-38
- (3) L.A.Cole, *J. Reprod. Med.*, **43** (1998) 3-10
- (4) L.A.Cole, K.M.Rinne, S.Shahabi et al., *Clin. Chem.*, **45** (1999) 313-314
- (5) A.Kardana, M.M.Elliot, M.A.Gawinowicz et al., *Endocrinology*, **129** (1991) 1541-1550
- (6) S.Birken, A.Krichevsky, J.O'Connor et al., *Endocrine*, **10** (1999) 137-144
- (7) A.Krichevsky, S.Birken, J.O'Connor et al., *Endocrinology*, **134** (1994) 1139-1145
- (8) G.Kovalevskaya, S.Birken, T.Kakuma et al., *J. Endocrinol.*, **161** (2000) 99-109
- (9) P.Mock, G.Kovalevskaya, J.F.O'Connor et al., *Hum. Reprod.*, **15** (2000) 2209-2214
- (10) P.Mock, P.Bischof, R.Rivest et al., *Hum. Reprod.*, **13** (1998) 2629-2632
- (11) D.Bellet, V.Lazar, J.Bieche et al., *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523
- (12) H.Alexander, C.Biesold, W.Weber et al., *Zentralbl. Gynäkol.*, **119** (1997) 17-22
- (13) H.Alexander, G.Zimmermann, G.W.Wolkersdörfer et al., *Hum.Reprod. Update*, **4** (1998) 550-559
- (14) H.Alexander, G.Zimmermann, C.Biesold et al., *J.Fertil.Reprod.(SH)*, **2** (1999) 28-37
- (15) G.W.Wolkersdörfer, S.R.Bornstein, G.Zimmermann et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **4** (1998) 179-184
- (16) G.Zimmermann, D.Baier, J.Majer et al., *Mol.Hum.Reprod.*, **9** (2003) 81-89
- (17) J.F.Kearney A.Radbruch, B.Liesegang et al., *J.Immunol.*, **123** (1979) 1548-1550
- (18) J.W.Littlefield et al., *Science*, **145** (1964) 709-712
- (19) M.B.Wilson and P.Nakane, in W.Knapp (ed.): *Immunofluorescence and related techniques*, Amsterdam 1978, pp. 215-224

Sequenzprotokoll:

SEQ ID NO 1

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / C-terminales Ende CTP / AS 109 -122

<160> 7

<210> 1

<211> 14

<212> Peptid

<213> β hCG endometrial, CTP, Exon 3

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 1 (ehCG β 7, β 6, β 6e ; Aminosäure 109 - 122)

1

5

10

14

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys

SEQ ID NO 2

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> trophoblastäres hCG β 5, β 8, β 3 / C-terminales Ende CTP / AS 109 - 122

<160> 7

<210> 2

<211> 14

<212> Peptid

<213> β hCG trophoblastär, CTP, Exon 3

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 2 (thCG β 5, β 8, β 3; Aminosäure 109 - 122)

1

5

10

14

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys

SEQ ID NO 3

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin

<130> endometriales hCG β 7, β 6, β 6e / AS -6 bis +6

<160> 7

<210> 3

<211> 12

<212> Peptid

<213> β hCG endometrial, Exon 2

<220>

<221>

<300>

<301>

<302>

<303>

<304>

<305>

<306>

<307>

<308>

<400> 3 (ehCG β 7, β 6, β 6e; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12
Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Met Leu Arg

SEQ ID NO 4

- <110> Universität Leipzig
- <120> Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
- <130> trophoblastäres hCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ / AS -6 bis +6
- <160> 7
- <210> 4
- <211> 12
- <212> *Peptid*
- <213> β hCG-trophoblastär, Exon 2
- <220>
- <221>
- <300>
- <301>
- <302>
- <303>
- <304>
- <305>
- <306>
- <307>
- <308>
- <400> 4 (thCG $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$; Aminosäure -6 bis +6)

1 5 10 12
Met Gly Gly Thr Trp Ala Ser Lys Glu Pro Leu Arg

<110>	Universität Leipzig	
<120>	Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin	
<130>		
<160>	7	
<210>	5	
<211>	165	
<212>	Peptid	
<213>	β hCG β 6e	(e β hCG Endo, Endometrium)
<220>		
<221>		
<300>		
<301>		
<302>		
<400>	5	(β hCG β 6e , Aminosäure-Sequenz des Gens im Endometrium)

														-20 Met
				-15					-10					-5
Glu	Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Gly
			-1		+1				5					10
Gly	Thr	Trp	Ala	...	Ser	Lys	Glu	Met	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg
			15						20					25
Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val
			30						35					40
Cys	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr
			45						50					55
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val
			60						65					70
Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro
			75						80					85
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala
			90						95					100
Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys
			105						110					115
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe
			120						125					130
Gln	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser
			135						140					145
Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln

<110>	Universität Leipzig
<120>	Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
<130>	
<160>	7
<210>	6
<211>	165
<212>	Peptid
<213>	βhCG β5, β8, β3 (tβhCG, Trophoblast)
<220>	
<221>	
<300>	
<301>	
<302>	
<400>	6 (βhCG β5, β8, β3, Aminosäure-Sequenz des Gens im Trophoblast)

														-20
														Met
														-5
				-15					-10					
Glu	Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Gly
			-1		+1				5					10
Gly	Thr	Trp	Ala	...	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg
			15						20					25
Pro	Ile	Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val
			30						35					40
Cys	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr
			45						50					55
Met	Met	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val
			60						65					70
Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro
			75						80					85
Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala
			90						95					100
Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Leu	Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys
			105						110					115
Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe
			120						125					130
Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser
			135						140					145
Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	Pro	Ile	Leu	Pro	Gln

SEQ ID No 7

<110> Universität Leipzig
 <120> Verfahren zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen durch Bestimmen von humanem endometrialen Choriongonadotropin
 <130>
 <160> 7
 <210> 7
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> β hCG β 6e (e β hCG Endo, Endometrium)
 <221>
 <301>
 <302>
 <303>
 <304>
 <305>
 <306>
 <307>
 <308>
 <400> 7 (β hCG β 6e, Sequenz des Gens im Endometrium)

agcactttcc	tggggtcacg	gcctcctcct	ggttcccaag	acccaccat	aggcagaggc	60
aggccttcct	acaccctact	otctgtgcct	ccagcctoga	ctagtcccta	gcactcgacg	120
actgagtctc	agaggtcact	tcaccgtggg	ctccgcctca	tccttgggcg	tagaccactg	180
aggggagagg	actgggggtgc	tccgctgagc	cactcctgtg	cctccctggc	cttgtctact	240
tctcgcccc	cgaagggtta	gtgtccagct	cactccagca	tcctacaacc	tcctgggtggc	300
cttgccgccc	ccacaaaccc	gaggtataaa	gccagggtaca	ccaggcaggg	gacgcaccaa	360
ggatggagat	gttcaggggg	ctgctgctgt	tgctgctgct	gagcatgggc	gggacatggg	420
catccaagga	gatgcttcgg	ccacgggtgc	gccccatcaa	tgccaccctg	gctgtggaga	480
aggagggtg	ccccgtgtgc	atcacccgtca	acaccaccat	ctgtgccggc	tactgcccc	540
ccatgaccgg	cgtgctgcag	gggttcctgc	cggccctgcc	tcagggtggg	tgcaactacc	600
gcgatgtgcg	cttcgagtcc	atccggctcc	ctggctgccc	gcgcggcggtg	aaccccggtg	660
tctcctaagc	cgtggctctc	agctgtcaat	gtgcactctg	ccgccgcagc	accactgact	720
gcgggggtcc	caaggaccac	cccttgacct	gtgatgacct	ccgcttcag	gcctcctott	780
cctcaaaggc	ccctccccc	agccttccaa	gtccatcccc	actcccgggg	ccctcggaca	840
cccogatcct	cccacaataa	a				861

★ ★

-360

-300

-240

-180 Primer 4

-120

-60

LH													leu						
hCG													phe	gln	****	Intron	*****		
LH4	A	G	T									C							
CG5	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG	GTA	AGA	CTG	CAG
CG6	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG					
CG7	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG					
Endo	GTA	CAC	CAG	GCA	GGG	GAC	GCA	CCA	AGG	ATG	GAG	ATG	TTC	CAG					
					-1	+1									+15				

LH
hCG *** *** *** *** *** gly leu leu leu leu leu leu leu ser met gly gly thr trp ala
LH4
CG5 ... TTG TCC CAG GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
CG6
CG7
Endo GGG CTG CTG CTG TTG CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA
+16 +30 +60

LH 1 arg 4 trp 10 his 20 ile
hCG ser lys glu pro leu arg pro arg cys arg pro ile asn ala thr leu ala val glu lys
LH4 G CCG T A T
CG5 TCC AAG GAG CCG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
CG6 A CCA C G C
CG7 A ATG C G C
Endo TCC AAG GAG ATG CTT CGG CCA CGG TGC CGC CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG
met +90 +120

LH 21 30 40
hCG glu gly cys pro val cys ile thr val asn thr thr ile cys ala gly tyr cys pro thr
LH4
CG5 GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
CG6
CG7
Endo GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC ACC ACC ATC TGT GCC GGC TAC TGC CCC ACC
+150 +180

LH 41 42
hCG met *** *** *** *** *** *** *** Intron *** *** *** *** *** *** *** thr
LH4 TG
CG5 ATG GTG AGC TGC CCG GGG CCG ... CCC CAC TCA CAC GGC TTC CAG ACC
CG6 CC
CG7 CC
Endo ATG ACC
+183 +186

LH 50 60
hCG Primer 2 ala pro thr
hCG arg val leu gln gly val leu pro ala leu pro gln val val cys asn tyr arg asp val
LH4 C C C
CG5 GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
CG6 G G G A
CG7 G G A
Endo CGC GTG CTG CAG GGG GTC CTG CCG GCC CTG CCT CAG GTG GTG TGC AAC TAC CGC GAT GTG
+210 +240

LH 70 80 phe
hCG arg phe glu ser ile arg leu pro gly cys pro arg gly val asn pro val val ser tyr
LH4 T G T
CG5 CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
CG6 C A A
CG7 C A
Endo CGC TTC GAG TCC ATC CGG CTC CCT GGC TGC CCG CGC GGC GTG AAC CCC GTG GTC TCC TAC
+270 +300

90 100

LH pro arg pro ser

hCG ala val ala leu ser cys gln cys ala leu cys arg arg ser thr thr asp cys gly gly

LH4 C T GC G C T T

CG5 GCC GTG GCT CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT GAC TGC GGG GGT

CG6 G C AA C A C

CG7 G C AA C A C

Endo GCC GTG GCT CTC AGC TGT CAA TGT GCA CTC TGC CGC CGC AGC ACC ACT GAC TGC GGG GGT

+330 +360

110 117 120

LH his glu leu ser gly leu leu phe leu ser

hCG pro lys asp his pro leu thr cys asp asp pro arg phe gln asp ser ser ser ser lys

LH4 A C C CAAC TCT CAG GCC TCC TCT TCC TCT AAA

CG5 CCC AAG GAC GAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG-C TTC CAG GAC TCC TCT TCC TCA AAG

CG6 G T G C

CG7 G T G C

Endo CCC AAG GAC CAC CCC TTG ACC TGT GAT GAC CCC CG C TTC CAG GCC TCC TCT TCC TCA AAG

+390 ala +420

130 140

hCG ala pro pro pro ser leu pro ser pro ser arg leu pro gly pro ser asp thr pro ile

LH4 A

CG5 GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC

CG6 C

CG7 C

Endo GCC CCT CCC CCC AGC CTT CCA AGT CCA TCC CGA CTC CCG GGG CCC TCG GAC ACC CCG ATC

+450 +480

145

hCG leu pro gln ter

LH4

CG5 CTC CCA CAA TAAA

CG6

CG7

Endo CTC CCA CAA

+495

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.